

518,870

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2003 年12 月31 日 (31.12.2003)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/000307 A1

(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: A61K 31/395,  
31/496, A61P 3/10, 9/00, 27/02, 29/00, 35/00, 43/00,  
C07D 498/18 // G01N 33/50, 33/15

CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県 川口市  
本町四丁目 1 番 8 号 Saitama (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/007813

(72) 発明者; および

(22) 国際出願日: 2003 年6 月19 日 (19.06.2003)

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 七里 真義  
(SHICHIRI, Masayoshi) [JP/JP]; 〒174-0065 東京都 板  
橋区 若木 1-2 7-1-1 2 0 6 Tokyo (JP). 田中 雄二  
郎 (TANAKA, Yujiro) [JP/JP]; 〒158-0086 東京都 世田  
谷区 尾山台 2-6-8 Tokyo (JP).

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(74) 代理人: 廣田 雅紀 (HIROTA, Masanori); 〒107-0052  
東京都 港区 赤坂二丁目 8 番 5 号若林ビル 3 階 Tokyo  
(JP).

(30) 優先権データ:  
特願2002-181281 2002 年6 月21 日 (21.06.2002) JP  
特願2003-118960 2003 年4 月23 日 (23.04.2003) JP

(81) 指定国 (国内): KR, US.

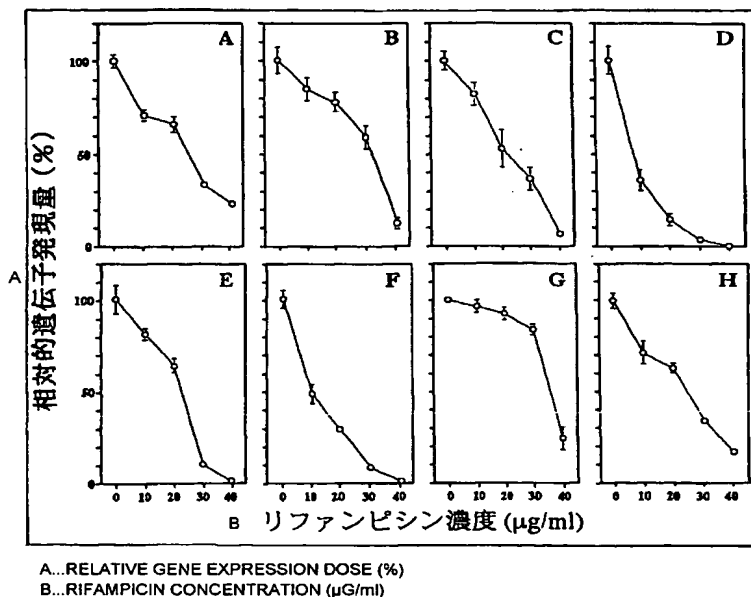
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 科学技術  
振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY,  
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC,  
NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

[続葉有]

(54) Title: NOVEL USE OF ANSAMYCIN ANTIBIOTICS AND METHOD OF SCREENING NOVEL ANGIOGENESIS INHIBITOR

(54) 発明の名称: アンサマイシン系抗生物質の新規用途及び新規血管新生抑制物質のスクリーニング方法



(57) Abstract: It is intended to provide a novel angiogenesis inhibitor which is efficacious against angiogenesis in various diseases, highly safe and highly useful in practice; and a method of screening the same. The angiogenesis inhibitor comprises, as the active ingredient, an ansamycin antibiotic such as rifampicin, rifamycin SV or 3-formyl rifamycin having been widely employed as an antibacterial agent in treating tuberculosis or infections with gram-positive bacteria. Such an active ingredient has an excellent effect of inhibiting angiogenesis. The angiogenesis inhibitor is efficacious in inhibiting angiogenesis in malignant tumor, diabetic retinopathy, retinal angiogenesis

[続葉有]

WO 2004/000307 A1



添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

---

and inflammatory diseases, inhibiting angiogenesis accompanying cardiovascular remodeling, etc. and, therefore, is usable as a remedy for each of the above diseases, etc. The screening method as described above makes it possible to effectively screen an angiogenesis inhibitor by detecting an angiogenesis inhibitory signal on the bases of gene expression.

(57) 要約: 種々の疾病における血管新生抑制に有効で、かつ安全で実用性の高い新規血管新生抑制剤、及びそのスクリーニング方法を提供するものである。本発明の血管新生抑制剤の有効成分は、従来より結核治療やグラム陽性菌感染などの抗菌剤として広く使用されてきたリファンピシンやリファマイシンSV、或いは3-フォルミルリファマイシンのようなアンサマイシン系の抗生物質からなる。本発明の有効成分は、優れた血管新生抑制作用を有する。本発明の血管新生抑制剤は、悪性腫瘍、糖尿病性網膜症、網膜血管新生症、炎症性疾患における血管新生抑制、及び心血管リモデリングに伴う血管新生抑制等に有効で、それぞれの疾病の治療剤等として用いることができる。また、本発明のスクリーニング方法は、遺伝子発現に基づく血管新生抑制シグナルの検出により、血管新生抑制物質の効果的なスクリーニングを可能とする。

## 明 細 書

## アンサマイシン系抗生物質の新規用途及び新規血管新生抑制物質のスクリーニング方法

5

## 技術分野

本発明は、血管新生抑制剤、更に詳しくは、悪性腫瘍、糖尿病性網膜症、網膜血管新生症、炎症性疾患、心血管リモデリングによる心血管疾患等における血管新生抑制に有効な新規血管新生抑制剤、及び血管新生抑制物質のスクリーニング方法に関する。

10

## 背景技術

血管新生とは、既存の血管から新しい血管が形成される現象であり、悪性（固形）腫瘍や糖尿病性網膜症、或いは網膜血管新生症や炎症性疾患（リュウマチ等）においては、その発症や進展に血管新生が深く関わっていることが知られている。例えば、固形腫瘍が増殖するには、血管新生によって栄養や酸素の供給と老廃物の除去の道を確保することが必須であり、また、癌治療上、重要な問題となっている転移において、その道を確保するという意味で血管新生が重要なステップとなっている。

糖尿病性網膜症は、血管新生そのものが病態であり、放置すると失明に至る。したがって、血管新生を抑制することがこの疾患の予防・治療に結びつくと考えられ、その予防・治療薬の開発が行われている。

15

20

このように、血管新生は、上記のような種々の病変において観察され、それぞれの病態の進展を助長するので、この血管新生の抑制がこれらの病態の予防・治療の観点から注目されている。血管新生に関わる疾患の予防または治療に向けて、血管新生を阻害する物質を探索すべく鋭意研究

25

が推進されている。その結果、現在では、多くの血管新生抑制物質が開発され、その中のいくつかの物質については、臨床上での有効性が検討されている。

例えば、エンドスタチンやアンジオスタチンなどの血管新生抑制因子は最も有用な腫瘍休眠療法薬と位置づけられ、実験動物の固形腫瘍を顕著に退縮させ (Cell, 88, 277-285, 1997)、反復投与を行っても従来の抗癌剤のような薬剤耐性を示さないため (Nature, 390, 404-407, 1997)、副作用の少ない理想的な抗癌剤となる可能性が指摘されていた。しかし、これらの因子は実用化されても抗腫瘍効果を示す有効な投与量の合成は容易ではなく、かつ製造コストも高くなることから、分子量 5 0 0 0 0 に及ぶアンジオスタチンの臨床応用を既に断念した企業もある。

そこで、アンジオスタチンより低分子量のエンドスタチン (約 2 0 0 0 0) が期待を集め、最近、末期悪性腫瘍患者に対する臨床治験が米国で開始されたが、その受容体はもちろん、そのメカニズムも不明であった。

エンドスタチンは、低血清培養下において内皮細胞の増殖を抑制し、アポトーシスを生ずる (J. Biol. Chem., 274, 11721-11726, 1999) が、その程度は軽微であり、それだけで癌の原発巣・転移巣を退縮させる効果を説明するのは困難であった。なぜなら腫瘍細胞は、遺伝子変異のみならず遺伝子発現調節異常によっても増殖能が亢進するうえ、多くの増殖因子や血管新生促進因子を盛んに産生・分泌し、オートクリン/パラクリンとして自己の増殖を促進させることに加え、更に、新生された血管が豊富な血流を供給するからである。エンドスタチンがこうした環境下にあっても、現在報告されているような腫瘍血管新生を抑制するためには、内皮細胞に特異的に作用する、強力な細胞内シグナルを惹起しなければならない。これらの作用メカニズムは長く不明であった。

一方、1957年イタリア Lepetit 社研究所の P. Sensi らは、地中海沿岸で採集した土壌より *Streptomyces mediterranei* (後に、*Nocardio mediterranei* と分類された) を分離し、その培養液よりグラム陽性菌、抗酸性菌に抗菌力を示す抗生物質、リファマイシンを得た。培養液中の

5 リファマイシンは、リファマイシン A, B, C, D, E などからなる混合物で、リファマイシン O はリファマイシン B の酸化型である。リファマイシン B 及びリファマイシン O は、リファマイシン S に誘導され、リファマイシン S はアスコルビン酸で還元するとリファマイシン S V となる。3-フォルミルリファマイシンは、リファマイシンを 3-フォルミル化したものである。リファンピシンは、リファマイシン S V を 3-フォルミル (3-formyl) 化したものから誘導されたものである。リファマイシンは、芳香環系をもち、これにアンサ環 (ansa ring) と呼ばれる脂肪族架橋が張られているので、アンサマイシン系抗生物質と総称される。

15 また、上記リファンピシン (Rifampicin) は、Ciba-Geigy 社 (スイス) と Lepetit 社 (イタリア) の共同研究によって開発されたアンサマイシン系抗生物質であり、リファマイシン S V の 3-フォルミル (3-formyl) 化したものから誘導されたものである。即ち、リファンピシンは、3-  
20 [(4-メチル-1-ピペラジニル) イミノ] メチル リファマイシン (3-[[4-methyl-1-piperazinyl]imino]methyl rifamycin) の構造を持つ、アンサマイシン系の半合成抗生物質であり、優れた抗結核作用を有し、結核治療剤として広く使用されてきた物質である。リファンピシンは、グラム陽性菌群のみならず、グラム陰性桿菌などにも抗菌活性を有し、結核以外にも、ブルセラ症、クラミジア感染、特にブドウ球菌な  
25 どのグラム陽性菌感染などに使用されてきた。

リファンピシンは、3-ホルミルリファマイシン S V をテトラヒドロ

フラン中で、1-アミノ-4-メチルピペラジンと反応させて合成されるが、工業的合成法を含めて、多くの合成法が開示されている（特公昭42-26800号公報、特公昭47-23303号公報、特公昭53-39400号公報、特公昭57-40155号公報、特公昭62-41671号公報、特公昭62-41672号公報、特公昭62-41673号公報）。

本発明の課題は、安全で実用性の高い新規血管新生抑制剤、更に詳しくは、悪性腫瘍、糖尿病性網膜症、網膜血管新生症及び炎症性疾患等、種々の疾病における血管新生抑制に有効で、かつ安全で実用性の高い新規血管新生抑制剤を提供することにある。また、本発明は血管新生抑制剤の有効成分となる新規血管新生抑制物質のスクリーニング方法を提供することにある。

本発明者は、上記課題を解決すべく、鋭意探索の結果、従来より優れた抗結核作用を有し、結核治療剤として広く使用されてきた物質であり、グラム陽性菌群のみならず、グラム陰性桿菌などにも抗菌活性を有し、結核以外にも、ブルセラ症、クラミジア感染、特にブドウ球菌などのグラム陽性菌感染などに使用されてきたリファンピシンが、優れた血管新生抑制作用を有することを見い出し、本発明を完成するに至った。また、本発明においては、リファマイシン-SV又は3-フォルミルリファマイシンなどのアンサマイシン系抗生物質が、血管新生抑制作用を有することを確認し、本発明をなした。

本発明において、リファンピシン等のアンサマイシン系抗生物質が、優れた血管新生抑制作用を有することを見い出したのは、本発明者がエンドスタチンの分子シグナルを明らかにしたことに始まる。本発明者は、最近、エンドスタチンによる血管新生抑制に関わる分子機構を発見した（FASEB Journal, 15, 1044-1053, 2001）。実験動物において腫瘍退縮効

果を示す濃度のエンドスタチンを投与すると、血清・増殖因子・血管新生因子刺激下の培養血管内皮細胞に発現する種々の初期応答遺伝子、アポトーシス・細胞周期・細胞遊走関連遺伝子は著明に抑制される。

5 こうした遺伝子発現量の低下の結果、内皮細胞増殖抑制作用は軽微だが、顕著な内皮遊走阻止作用をきたす。このようなエンドスタチンによる強力かつ広範囲にわたる遺伝子発現の抑制という細胞内応答を本発明者は「血管新生抑制シグナル」と命名したが、real-time 定量的PCR法にてmRNA量の変化を検出することにより、短期間に数多くの因子の中からエンドスタチンと類似で、かつ作用が強力なシグナルを示すものを捜し出し、内皮細胞遊走阻止作用・増殖抑制作用をあわせて検討することが可能となった。

15 従来、これらの血管新生抑制因子を発見、取得するまでのプロセスは、悪性腫瘍自身が血管新生抑制因子を産生しているであろうとのデータをもとに、腫瘍に対する退縮効果を指標として、目的とする物質が含まれる大量の体液・細胞培養上清などの濃縮を繰り返して蛋白を精製したため、遺伝子クローニングに至るまでには長い経過を要した。更に、例えば、分子量の大きいエンドスタチンやアンジオスタチンなどの血管新生抑制因子は、抗腫瘍作用を示す投与量の血管新生抑制因子を得るための合成は容易ではなかった。

20 本発明者の構築した「血管新生抑制シグナル」を検出する血管新生抑制物質のスクリーニング方法により、多くの作用未知の物質の中からエンドスタチン型のシグナルを示す因子を検出することが可能となり、その中から、腫瘍退縮作用、新生血管抑制作用を検討することにより、新規の血管新生抑制因子を発見することが可能となった。このスクリーニング方法により、従来のプロセスは大幅に短縮され、また、エンドスタチンと同等の効果を発現するために必要なペプチド・蛋白・薬剤の投与

量はどの程度かもあらかじめ推測することが可能となった。

本法は腫瘍新生血管標的療法などの目的で臨床的に応用可能な新規因子の発見をめざすことを可能とし、更に、エンドスタチンの作用に基づく、血管新生抑制シグナルが普遍的に腫瘍退縮効果に相関することが確認されれば、これを指標に多くの合成ペプチドや化合物の生理活性を効率的にスクリーニングできる。すなわち、培養血管内皮細胞を用いて被検物質を添加し、遺伝子の発現に基づく血管新生抑制シグナルを検出すれば、多くの新規な血管新生抑制物質の効率的なスクリーニングが可能となる。そして、ペプチド・蛋白については分子量が比較的小さく、容易に臨床応用しやすい物にターゲットを絞って開発することが可能であり、また、薬剤や食品の成分についてもヒトに対する副作用などをスクリーニングの段階であらかじめ推測することも可能となる。

本発明においては、上記スクリーニング方法によるアプローチにより、多くの候補物質の中から、リファンピシンのようなアンサマイシン系抗生物質が、強力な血管新生抑制作用を有することを見い出した。リファンピシンのようなアンサマイシン系抗生物質は、抗菌性の医薬として利用されていたものであるから、その安全性は確認されているものであり、その製造方法や投与方法も確立されているものであるから、実用性の高い血管新生抑制剤としての利用が期待できるものである。

20

#### 発明の開示

すなわち本発明は、アンサマイシン系抗生物質又はその薬理的に許容し得る誘導体を有効成分として含有してなる血管新生抑制剤(請求項1)や、アンサマイシン系抗生物質が、リファンピシン、リファマイシン-S V又は3-フォルミルリファマイシンであることを特徴とする請求項1記載の血管新生抑制剤(請求項2)や、薬理的に許容し得る誘導体が、

25



薬理的に許容し得る塩又はその水和物であることを特徴とする請求項 1  
又は 2 記載の血管新生抑制剤（請求項 3）や、血管新生抑制が、悪性腫  
瘍における血管新生抑制であることを特徴とする請求項 1～3 のいずれ  
か記載の血管新生抑制剤（請求項 4）や、血管新生抑制が、糖尿病性網  
5 膜症における血管新生抑制であることを特徴とする請求項 1～3 のい  
ずれか記載の血管新生抑制剤（請求項 5）や、血管新生抑制が、網膜血管  
新生症における血管新生抑制であることを特徴とする請求項 1～3 のい  
ずれか記載の血管新生抑制剤（請求項 6）や、血管新生抑制が、炎症性  
疾患における血管新生抑制であることを特徴とする請求項 1～3 のい  
10 ずれか記載の血管新生抑制剤（請求項 7）や、血管新生抑制が、心血管リ  
モデリングに伴う血管新生抑制であることを特徴とする請求項 1～3 の  
いずれか記載の血管新生抑制剤（請求項 8）からなる。

また本発明は、培養血管内皮細胞に被検物質を添加し、遺伝子の発現  
に基づく血管新生抑制シグナルを検出することを特徴とする血管新生抑  
15 制物質のスクリーニング方法（請求項 9）や、培養細胞系における遺伝  
子発現量の変化に基づく血管新生抑制シグナルが、腫瘍退縮効果を示す  
濃度のエンドスタチンを投与した場合に惹起される遺伝子発現変化と類  
似であることを特徴とする請求項 9 記載の血管新生抑制物質のスクリー  
ニング方法（請求項 10）や、培養細胞系における遺伝子発現量の変化  
20 に基づく血管新生抑制シグナルが、血管内皮細胞に発現する初期応答遺  
伝子及びその関連遺伝子、増殖・細胞周期関連遺伝子、接着因子、血管  
作動性因子、及び血管作動性因子受容体遺伝子の 1 又は 2 以上の遺伝子  
の発現であることを特徴とする請求項 9 又は 10 記載の血管新生抑制物  
質のスクリーニング方法（請求項 11）からなる。

## 図面の簡単な説明

第1図は、ヒト成人皮膚毛細血管内皮細胞に対して、各濃度のリファンピシンを添加した結果惹起された、リファンピシンによる血管新生抑制シグナルを示す図である。A：F A K遺伝子、B：P E C A M-1遺伝子、C：インテグリン- $\alpha$  v 遺伝子、D：インテグリン- $\beta$  3 遺伝子、E：エンドセリン-1 遺伝子、F：E T B 遺伝子、G：c - m y c 遺伝子、H：F 1 t 遺伝子。

第2図は、72時間増殖アッセイ変法（10%牛胎児血清含有増殖培地培養下）を用いて、リファンピシンによるヒト成人毛細血管内皮細胞に対する増殖抑制作用を示す図である。

第3図は、コンフルエントに達した培養ヒト成人皮膚微小血管内皮細胞の denudement 後の wounding edge の前進距離の時間経過を示す図である。細胞遊走は培養培地へのリファンピシン添加によって有意に抑制されている。

第4図は、ヌードマウスにヒト大腸癌由来細胞株（C W - 2）を移植して作製した固形腫瘍に対し、リファンピシンを経口的に摂取させ、腫瘍増大抑制作用を示すかどうかを検討した結果を示す図である。腫瘍体積はリファンピシン経口摂取によって、有意に抑制されている。

第5図は、肺結核を発症したC型肝硬変患者に、リファンピシンを長期投与した際に得られたデータ、即ち、2例の患者の血中 $\alpha$ -フェトブロテイン値の推移とリファンピシン投与との関係を示す図である。

第6図は、ヒト網膜血管内皮細胞に対して、各濃度のリファンピシン、リファマイシン-S V 及び3-フォルミルリファマイシンを添加した結果惹起された、血管新生抑制シグナルを示す図である。c - m y c、インテグリン- $\alpha$  v、インテグリン- $\beta$  3 の各mRNA量が、いずれも濃度依存的に抑制されていることを示す。

発明を実施するための最良の形態

本発明は、アンサマイシン系抗生物質又はその薬理的に許容し得る誘導体を有効成分として含有してなる血管新生抑制剤からなる。本発明における血管新生抑制剤の適用対象としては、特に制限はないが、悪性腫瘍における血管新生抑制、糖尿病性網膜症における血管新生抑制、網膜血管新生症における血管新生抑制、炎症性疾患における血管新生抑制、心血管リモデリングに伴う血管新生抑制等に用いて、それぞれ抗腫瘍剤、糖尿病性網膜症治療剤、網膜血管新生症治療剤、炎症性疾患治療剤、又は動脈硬化、血管障害治療剤等として用いることが出来る。

- 5      本発明の有効成分は、リファンピシン、リファマイシン-S V、3-フォルミルリファマイシン等のアンサマイシン系抗生物質からなる。本発明の有効成分は、その投与のために、例えば、水に対する溶解度を増すために適宜、薬理的に許容し得る誘導体に変換することができる（特公平5-44467号公報）。その薬理的に許容し得る誘導体の一つとして、通常医薬の製剤化において用いられている薬理的に許容し得る塩又はその水和物等の形に変換することが出来る。リファンピシン等の本発明の有効成分の調製には、前記したように、既に公知のいずれの製造方法をも用いることが出来る。
- 10      本発明の有効成分は、リファンピシン、リファマイシン-S V、3-フォルミルリファマイシン等のアンサマイシン系抗生物質からなる。本発明の有効成分は、その投与のために、例えば、水に対する溶解度を増すために適宜、薬理的に許容し得る誘導体に変換することが出来る（特公平5-44467号公報）。その薬理的に許容し得る誘導体の一つとして、通常医薬の製剤化において用いられている薬理的に許容し得る塩又はその水和物等の形に変換することが出来る。リファンピシン等の本発明の有効成分の調製には、前記したように、既に公知のいずれの製造方法をも用いることが出来る。
- 15      本発明の有効成分は、リファンピシン、リファマイシン-S V、3-フォルミルリファマイシン等のアンサマイシン系抗生物質からなる。本発明の有効成分は、その投与のために、例えば、水に対する溶解度を増すために適宜、薬理的に許容し得る誘導体に変換することが出来る（特公平5-44467号公報）。その薬理的に許容し得る誘導体の一つとして、通常医薬の製剤化において用いられている薬理的に許容し得る塩又はその水和物等の形に変換することが出来る。リファンピシン等の本発明の有効成分の調製には、前記したように、既に公知のいずれの製造方法をも用いることが出来る。

- 20      本発明の血管新生抑制剤の投与に当たっては、その対象に応じて、経口投与又は非経口投与（静脈内、筋肉内、皮下或いは点眼など）の適宜の投与方法を用いることが出来る。経口投与の場合は、本発明の有効成分を、固体又は液体の調剤として、例えば錠剤、顆粒剤、カプセル、粉末、トローチ、溶液、懸濁液或いは乳液のような形態で、製剤化することができる。非経口投与の場合は、本発明の有効成分を適当な溶媒を用いた、例えば注射可能な調剤に調製することが出来る。そのような溶媒としては、例えば、水、水性溶媒（塩化ナトリウム溶液、ブドウ糖溶液
- 25      本発明の血管新生抑制剤の投与に当たっては、その対象に応じて、経口投与又は非経口投与（静脈内、筋肉内、皮下或いは点眼など）の適宜の投与方法を用いることが出来る。経口投与の場合は、本発明の有効成分を、固体又は液体の調剤として、例えば錠剤、顆粒剤、カプセル、粉末、トローチ、溶液、懸濁液或いは乳液のような形態で、製剤化することができる。非経口投与の場合は、本発明の有効成分を適当な溶媒を用いた、例えば注射可能な調剤に調製することが出来る。そのような溶媒としては、例えば、水、水性溶媒（塩化ナトリウム溶液、ブドウ糖溶液

など)、水混和性溶媒(エチルアルコール、ポリエチレングリコール、プロピレングリコールなど)、及び非-水性溶媒(トウモロコシ油、綿実油、落花生油、ゴマ油など)が挙げられる。糖尿病性網膜症のような疾病への適用に際しては、本発明の有効成分を、点眼薬の製剤形態として投与  
5 することが出来る。

本発明有効成分の投与量は、投与対象、投与形態によって、適宜定められるものであるが、経口投与のための単位投薬量は、例えば約50～1000mgの活性成分、好ましくは約150～500mgの活性成分が含まれる量を挙げる事ができる。

10 本発明の有効成分であるリファンピシンは、既に結核患者等、極めて多くの患者に使用されてきた薬剤であり、その用法や副作用も熟知されているところから、本発明の薬剤の使用に当たっては、それらの経験に基づいた、投薬形態、投薬方法を用いることが出来る。

また、本発明は、新規血管新生抑制物質のスクリーニング方法を包含  
15 する。該本発明の血管新生抑制物質のスクリーニングを実施するには、培養血管内皮細胞を用いて被検物質を添加し、遺伝子の発現に基づく血管新生抑制シグナルを検出することにより行う。該遺伝子の発現に基づく血管新生抑制シグナルとしては、腫瘍退縮効果を示す濃度のエンドスタチンを投与した場合の遺伝子の発現シグナルを用いることができる。

20 かかる遺伝子の発現に基づく血管新生抑制シグナルとしては、遺伝子の発現に基づく血管新生抑制シグナルが、血管内皮細胞に発現する初期応答遺伝子及びその関連遺伝子、増殖・細胞周期関連遺伝子、接着因子、血管作動性因子、及び血管作動性因子受容体遺伝子の1又は2以上の遺伝子の発現を挙げる事ができる。

25 該血管新生抑制シグナル遺伝子を具体的に例示すると、血管内皮細胞に発現する初期応答遺伝子としては、c-myc、c-fosが、その

関連遺伝子としては、max、mad、mxilが、増殖・細胞周期関連遺伝子としては、mitogen activated protein kinase-1, mitogen activated protein kinase-2が、接着因子としては、インテグリン- $\alpha$ v (integrin alpha v)、インテグリン- $\beta$ 3 (integrin beta 3)が、血管作動性因子としては、エンドセリン-1 (endothelin-1)の遺伝子が、及び血管作動性因子受容体の遺伝子としては、ET-A、AT1、AT2の各遺伝子が挙げられる。

本発明の新規血管新生抑制物質のスクリーニング方法により、遺伝子の発現に基づく血管新生抑制シグナルを検出するには、血管内皮細胞を用いて、それ自体公知の検出方法により実施することができる。例えば、スクリーニングに用いる細胞としては、血管内皮細胞、特にヒト成人皮膚毛細血管内皮細胞や、ヒト網膜血管由来内皮細胞を用いることができる。遺伝子の発現の検出も、それ自体公知の遺伝子の発現検出手段によって行うことができる。その手段の1つとして、real-time 定量的PCR法を用いて、mRNAの変化を検出することにより、遺伝子の発現に基づく血管新生抑制シグナルを検出することができる。

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

#### 実施例1. リファンピシンによる血管新生抑制シグナル

ヒト成人皮膚毛細血管内皮細胞を、血清・増殖因子・血管新生促進因子の存在下で指数関数的増殖状態にし、各濃度のリファンピシンを添加し4時間後にRNAを抽出し、LightCyclerによる高感度real-time 定量的PCR法 (FASEB J., 15, 1044-1053, 2001) にて種々の遺伝子のmRNA量を定量した。結果を、第1図に示す。図中Aは、focal adhesion kinase 遺伝子を、Bは platelet endothelial cell adhesion molecule - 1 (PECAM-1) 遺伝子を、Cは接着因子であるインテグリン- $\alpha$

v 遺伝子を、Dは接着因子であるインテグリン- $\beta$ 3 遺伝子を、Eは血管収縮性ペプチドであるエンドセリン-1 遺伝子を、Fはエンドセリン受容体サブタイプB (ETB) 遺伝子を、Gは初期応答遺伝子である c-myc 遺伝子を、Hは vascular endothelial growth factor (VEGF) 受容体のサブタイプである Flt 遺伝子をそれぞれ定量した結果をあらわす。

第1図に示されるように、各濃度のリファンピシンの添加は、エンドスタチン類似のスペクトルを示す血管新生抑制シグナルを惹起した。

#### 実施例2. リファンピシンによる血管内皮細胞増殖抑制作用

10 72時間増殖アッセイ (Cell, 88, 277-85, 1997) 変法にてリファンピシンの内皮細胞の増殖に対する作用を検討した。

即ち、10%牛胎児血清含有増殖培地培養下において指数関数的増殖状態にあるヒト成人皮膚毛細血管内皮細胞に対して、各濃度のリファンピシンを添加48~72時間後に細胞数を自動血球計測装置にて測定した。

結果を、第2図に示す。リファンピシンは濃度依存性にヒト成人皮膚毛細血管内皮細胞の増殖を抑制した。

#### 実施例3. リファンピシンによる血管内皮細胞遊走抑制作用

20 Monolayer wounding 法 (FASEB J., 15, 1044-1053, 2001) により、リファンピシンの細胞遊走抑制作用を検討した。

即ち、10%牛胎児血清含有増殖培地培養下でコンフルエントに達したヒト成人皮膚毛細血管内皮細胞に対して、あらかじめ  $40 \mu\text{g}/\text{ml}$  のリファンピシンを添加し、24時間後に monolayer wounding 法で denuding を行い、顕微鏡写真を経時的に撮影して、wounding edge の前進距離を計測した。

結果を、第3図に示す。リファンピシン  $40 \mu\text{g}/\text{ml}$  添加によって

血管内皮細胞の前進距離は著明に減少した。

第3図に示されるように、リファンピシンはヒト成人皮膚毛細血管内皮細胞の chemotactic な遊走を抑制した。

#### 実施例4．実験動物移植腫瘍における抗腫瘍効果

- 5      ノードマウスにヒト大腸癌由来細胞株（CW-2）を移植して作製した固形腫瘍に対し、リファンピシンを経口的に摂取させ、腫瘍退縮効果・転移巣退縮効果を示すかどうかを O' Raily らの原法（Cell, 79, 315-28, 1994、Cell, 88, 277-85, 1997）に従って検討した。結果を、第4図に示す。
- 10      固形腫瘍のサイズが 200 mm<sup>3</sup> に達した段階でリファンピシンを経口摂取させると、第4図に示されるように、リファンピシン非摂取群に比較して有意に腫瘍増大は抑制された。

#### 実施例5．C型肝硬変による原発性肝癌患者における使用経験

- 15      肝臓病を専門とする本発明者は、偶然、肺結核を発症したC型肝硬変患者にリファンピシンを投与したところ、 $\alpha$ -フェトプロテイン値が急激に低下することに気づいた。また、従来は頻回に肝癌を発症していたにもかかわらず、長期にわたって原発性肝癌の発症が見られなくなったことに気づいた。2例の患者の血中 $\alpha$ -フェトプロテイン値の推移とリファンピシン投与との関係を第5図に示す。

- 20      実施例6．リファンピシン、リファマイシンSV、及び3-フォルミルリファマイシンの添加による血管新生抑制シグナル（遺伝子発現量の変化）

- 25      ヒト網膜血管内皮細胞を、血清・増殖因子・血管新生促進因子の存在下で指数関数的増殖状態にし、各濃度のリファンピシン、リファマイシン-SV及び3-フォルミルリファマイシンを添加し、4時間後にRNAを抽出し、前述の LightCycler による高感度 real-time 定量的PCR

法にて種々の遺伝子のmRNA量を定量した。その結果を第6図に示す。  
A、B及びCはc-myc遺伝子を、D、E及びFはインテグリン- $\alpha$   
v遺伝子を、G、H及びIはインテグリン- $\beta$ 3遺伝子を定量した結果  
を示す。また、A、D及びGはリファンピシン添加後の、B、E及びH  
5 はリファマイシン-SV添加後の、C、F及びIは3-フォルミルリフ  
ァマイシン添加後の各mRNA量の変化を示したものである。第6図に  
示されるように、リファンピシンによる血管新生抑制シグナル惹起作用  
は、糖尿病性網膜症の病態を形成するヒト網膜血管由来内皮細胞におい  
ても顕著に見られると同時に、リファンピシンの誘導体であるリファマ  
10 イシン-SV及び3-フォルミルリファマイシンのいずれも強力な同様の  
作用を示すことが明らかとなった。

#### 産業上の利用可能性

本発明により、強力な血管新生抑制作用を有し、悪性腫瘍、糖尿病性  
15 網膜症、網膜血管新生症、炎症性疾患、及び心血管疾患等、広い範囲の  
疾病における血管新生抑制に使用して、それぞれ抗腫瘍剤、糖尿病性網  
膜症治療剤、網膜血管新生症治療剤、炎症性疾患治療剤、又は心血管疾  
患治療剤等として用いることが可能な血管新生抑制剤を提供することが  
できる。本発明の有効成分であるリファンピシンは、抗菌性の医薬とし  
20 て利用されていたものであるから、その安全性は確認されているもので  
あり、その製造方法や投与方法も確立されているものであるから、本発  
明の血管新生抑制剤は、実用性の高い血管新生抑制剤として期待できる  
ものである。また、本発明は、血管新生抑制剤の有効成分となる新規血  
管新生抑制物質のスクリーニング方法を提供する。本発明の遺伝子の発  
25 現に基づく「血管新生抑制シグナル」を検出する血管新生抑制物質のス  
クリーニング方法により、多くの作用未知の物質の中から、血管新生抑



制作用を有する物質を効果的に検出することが可能となり、このスクリーニング方法により、従来のプロセスは大幅に短縮され、また、既存の薬剤であるエンドスタチンと同等の効果を発現するために必要なペプチド・蛋白・薬剤の投与量はどの程度かを予め推測するようなことも可能となった。

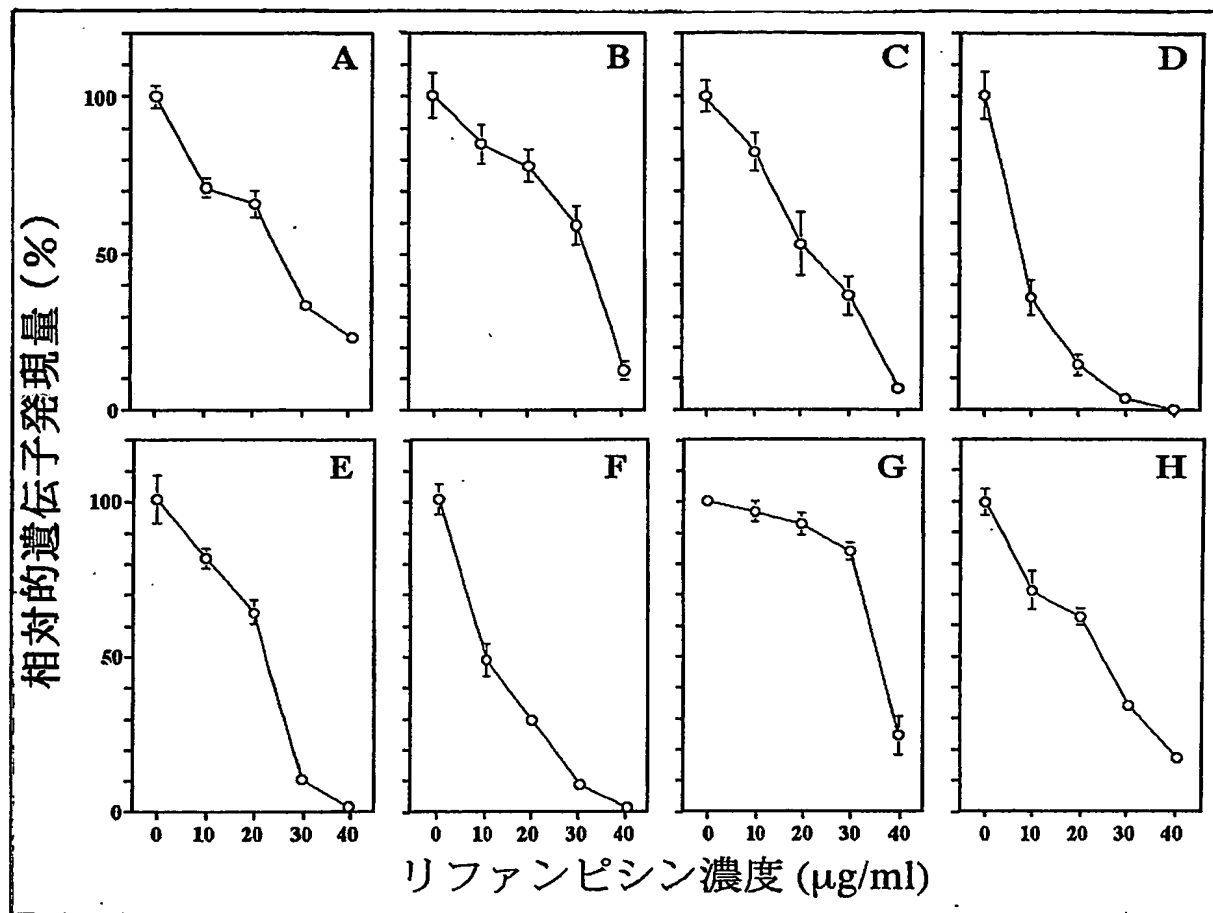
5

## 請 求 の 範 囲

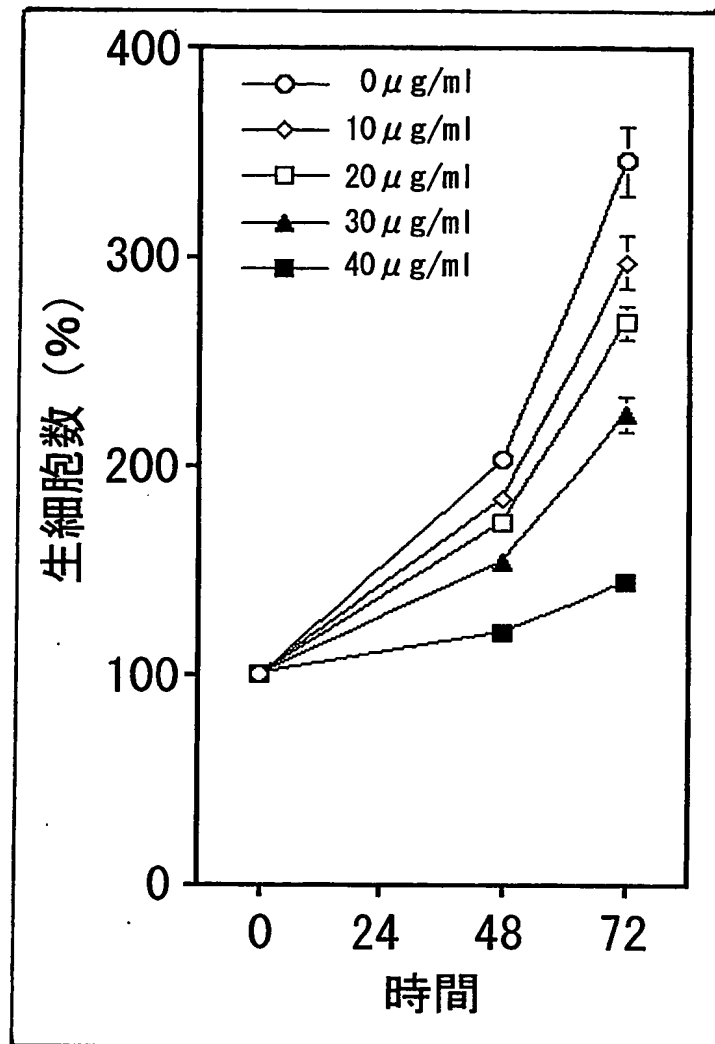
1. アンサマイシン系抗生物質又はその薬理的に許容し得る誘導体を有効成分として含有してなる血管新生抑制剤。
- 5 2. アンサマイシン系抗生物質が、リファンピシン、リファマイシン-  
SV又は3-フォルミルリファマイシンであることを特徴とする請求項  
1記載の血管新生抑制剤。
3. 薬理的に許容し得る誘導体が、薬理的に許容し得る塩又はその水和物であることを特徴とする請求項1又は2記載の血管新生抑制剤。
- 10 4. 血管新生抑制が、悪性腫瘍における血管新生抑制であることを特徴  
とする請求項1～3のいずれか記載の血管新生抑制剤。
5. 血管新生抑制が、糖尿病性網膜症における血管新生抑制であることを  
特徴とする請求項1～3のいずれか記載の血管新生抑制剤。
6. 血管新生抑制が、網膜血管新生症における血管新生抑制であることを  
15 特徴とする請求項1～3のいずれか記載の血管新生抑制剤。
7. 血管新生抑制が、炎症性疾患における血管新生抑制であることを特  
徴とする請求項1～3のいずれか記載の血管新生抑制剤。
8. 血管新生抑制が、心血管リモデリングに伴う血管新生抑制であるこ  
とを特徴とする請求項1～3のいずれか記載の血管新生抑制剤。
- 20 9. 培養血管内皮細胞に被検物質を添加し、遺伝子の発現に基づく血管  
新生抑制シグナルを検出することを特徴とする血管新生抑制物質のスク  
リーニング方法。
10. 培養細胞系における遺伝子発現量の変化に基づく血管新生抑制シ  
グナルが、腫瘍退縮効果を示す濃度のエンドスタチンを投与した場合に  
25 惹起される遺伝子発現変化と類似であることを特徴とする請求項9記載  
の血管新生抑制物質のスクリーニング方法。

- 1 1 . 培養細胞系における遺伝子発現量の変化に基づく血管新生抑制シグナルが、血管内皮細胞に発現する初期応答遺伝子及びその関連遺伝子、増殖・細胞周期関連遺伝子、接着因子、血管作動性因子、及び血管作動性因子受容体遺伝子の 1 又は 2 以上の遺伝子の発現であることを特徴とする請求項 9 又は 1 0 記載の血管新生抑制物質のスクリーニング方法。
- 5

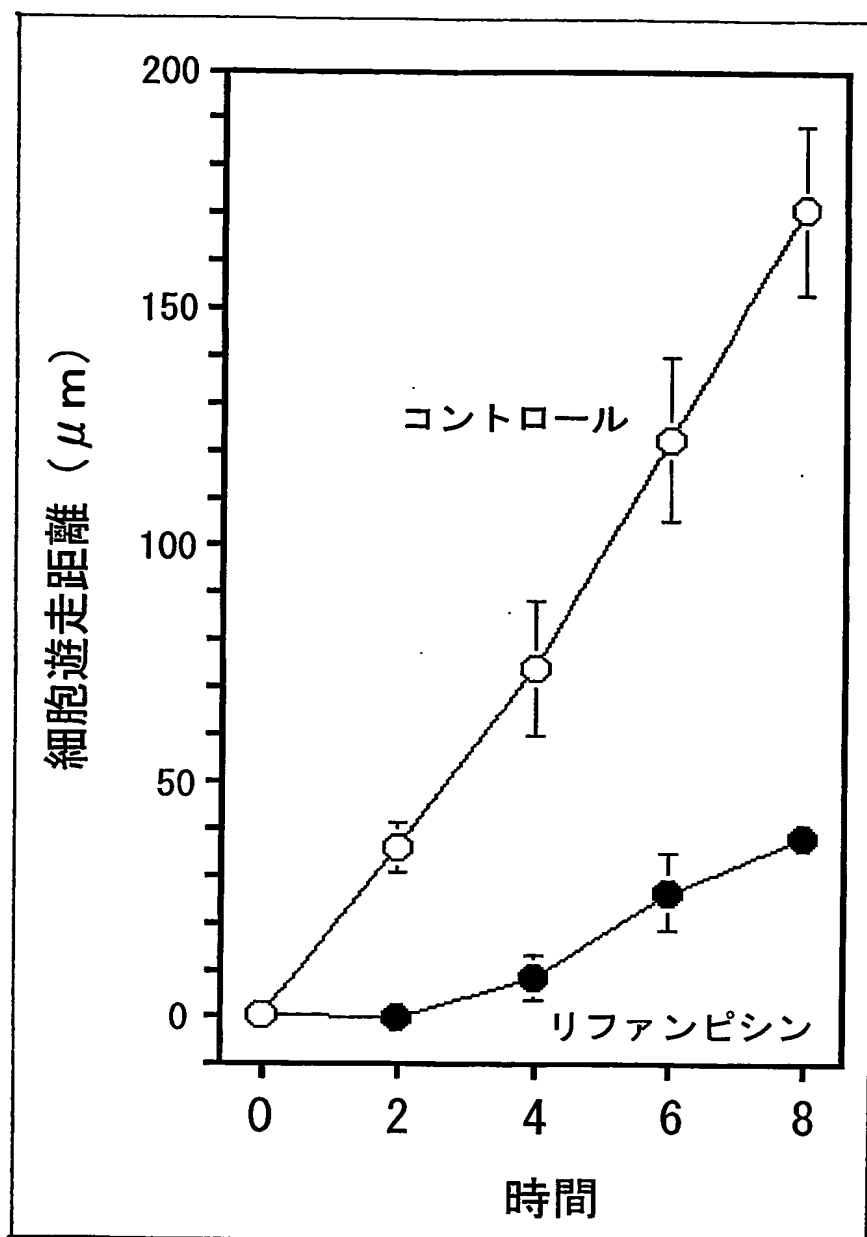
## 第 1 図



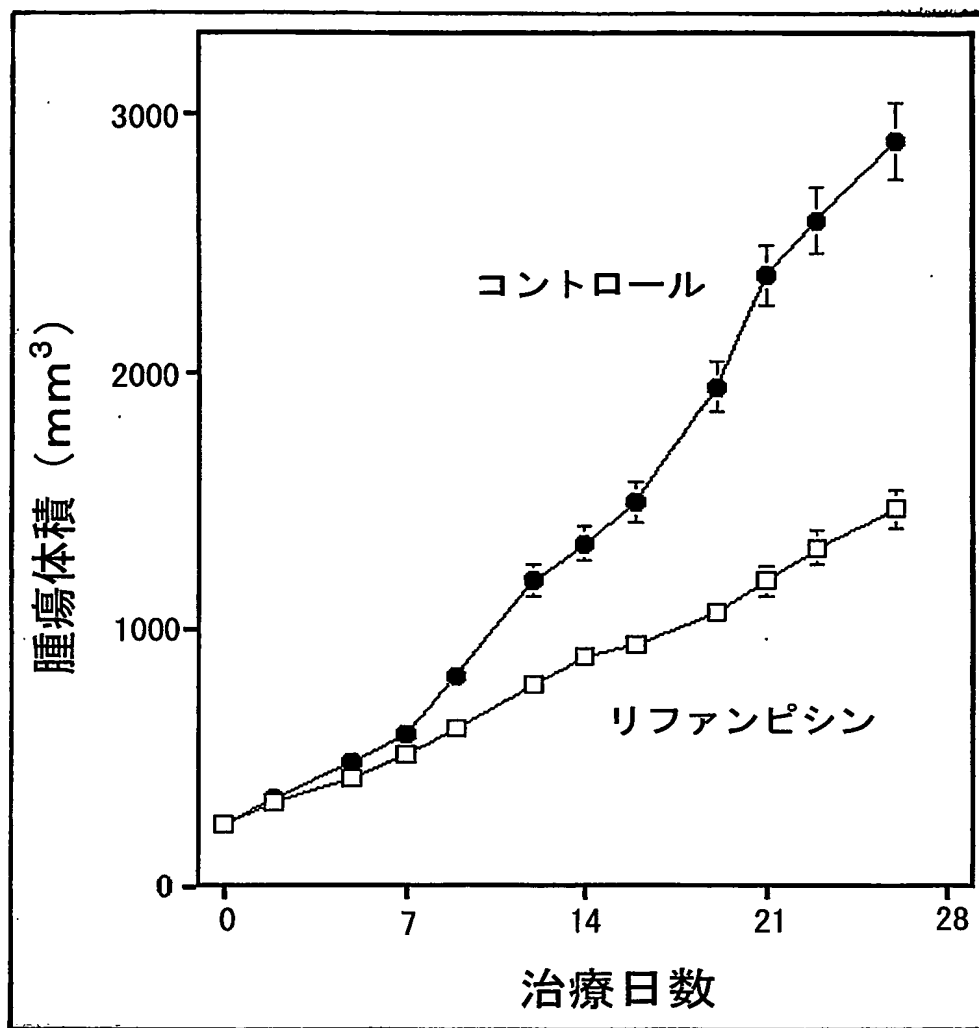
## 第 2 図



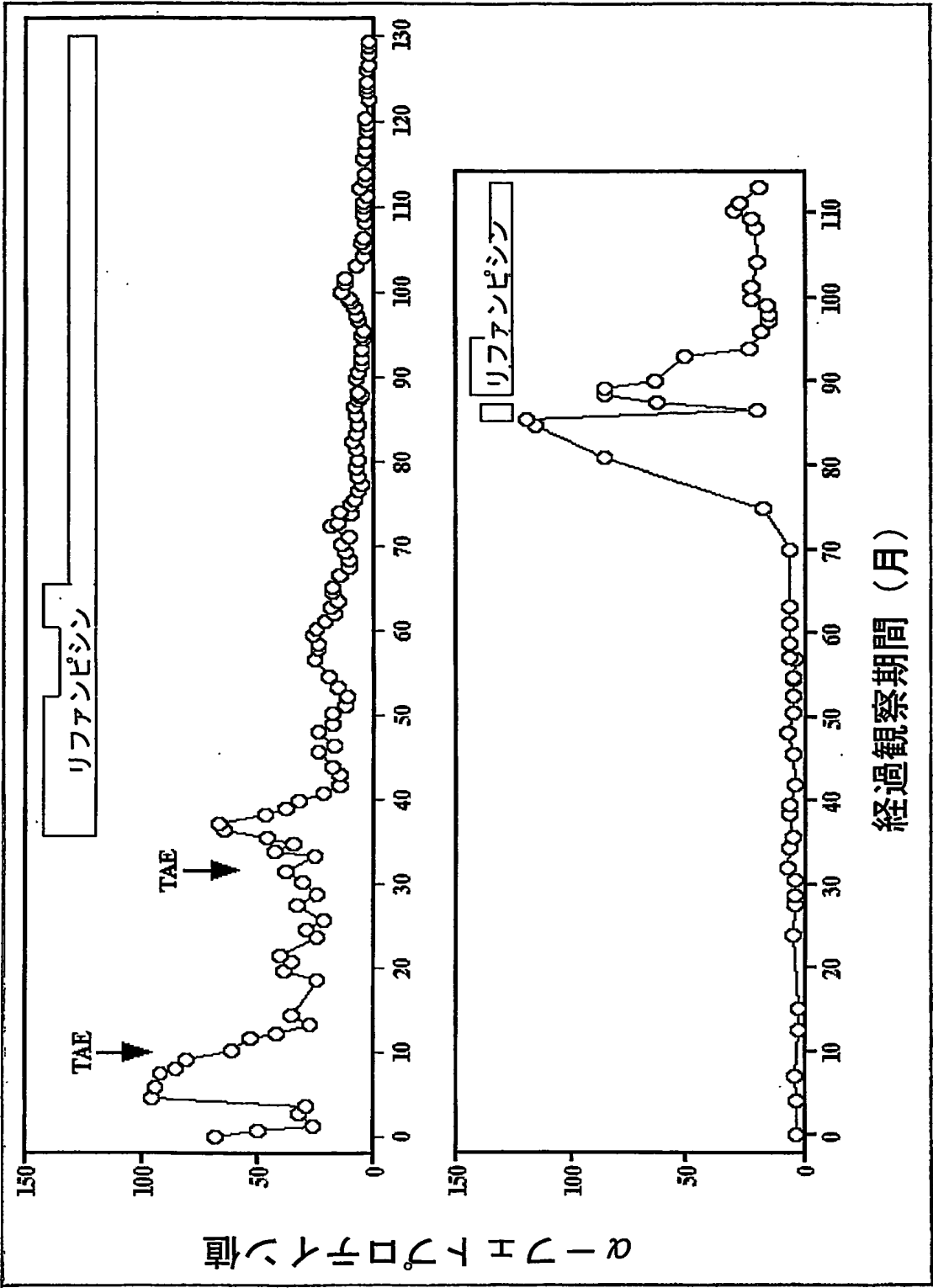
## 第 3 図



## 第 4 図

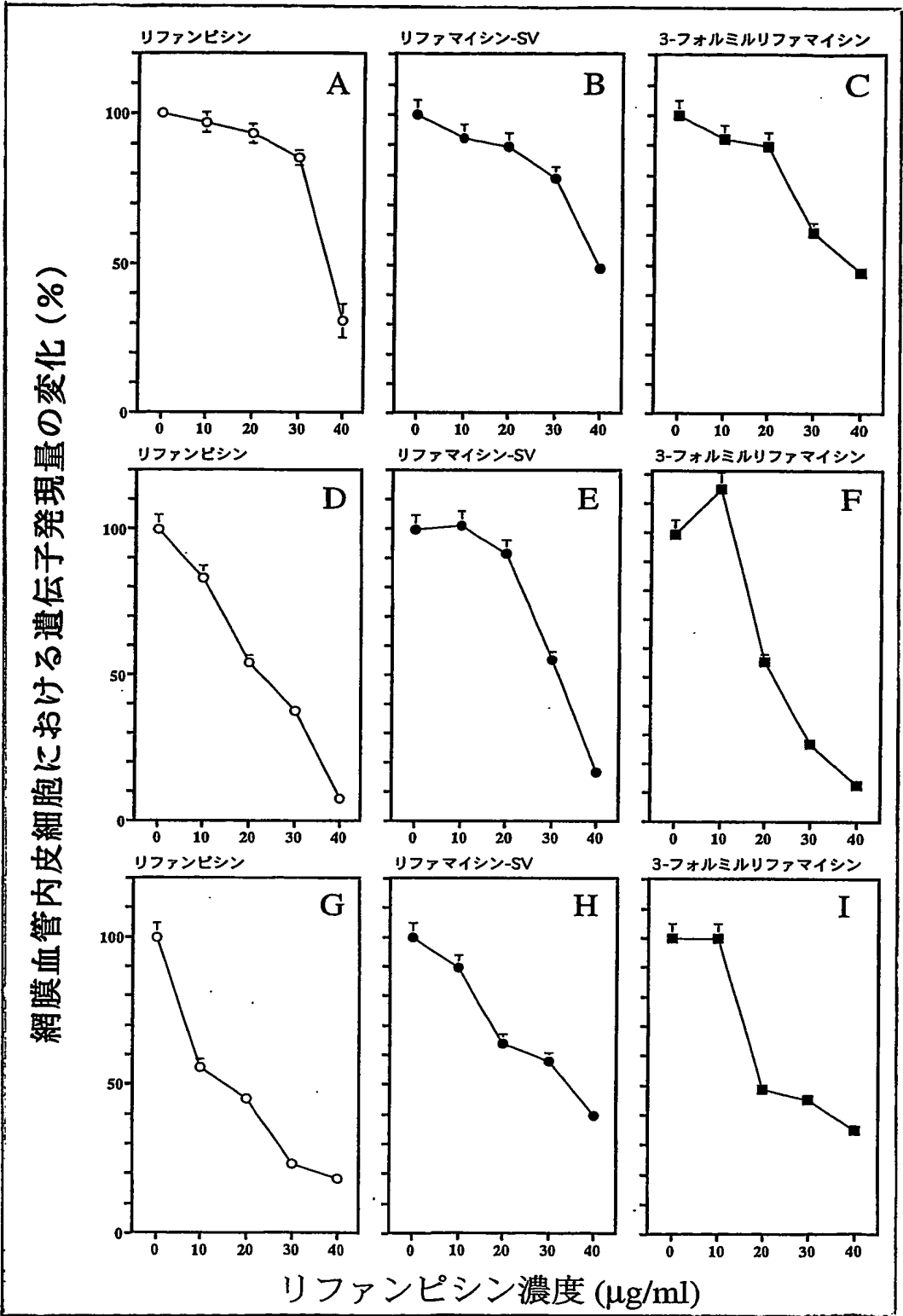


第 5 図





第 6 図



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/07813

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A61K31/395, 31/496, A61P3/10, 9/00, 27/02, 29/00, 35/00,  
43/00, C07D498/18//G01N33/50, 33/15

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K31/395, 31/496, C07D498/08//G01N33/50, 33/15

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DEMKOW, Urszula et al., The influence of rifampicin on selected parameters of immunological response, Pneumonologia i Alergologia Polska, 1998, Vol.66, No.1-2, pages 45 to 53	1-8
Y		1-8
X	T. YAMASHITA et al., A NEW ACTIVITY OF HERBIMYCIN A: INHIBITION OF ANGIOGENESIS, J. Antibiotics, 1989, Vol.42, No.6, p.1015-7	1, 3-8
Y		1-8
Y	Yoshimasa UEHARA, Mechanism of Action of an Inhibitor of src Oncogene Group Tyrosine Kinases and Its Effects on Cell Transformation and Growth, Advances in pharmaceutical sciences, 1992, Vol.8, pages 82 to 95, Fig. 5	1-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
29 July, 2003 (29.07.03)

Date of mailing of the international search report  
12 August, 2003 (12.08.03)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/07813

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 01/11086 A2 (EOS BIOTECHNOLOGY, INC.), 15 February, 2001 (15.02.01), Full text; particularly, Claims; page 14, lines 21 to 28 & US 2002/0015970 A1 & JP 2003-517816 A	9 10,11
Y	Masayoshi SHICHIRI et al., Antiangiogenesis signals by endos tatin, FASEB Journal, 2001, Vol.15, p.1044-53	10,11

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/07813

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

It is recognized that the technical feature common to the inventions as set forth in claims 1 to 8 and the inventions as set forth in claims 9 to 11 resides in an angiogenesis inhibitor. However, such a substance had been publicly known (see, if necessary, T. YAMASHITA et al., A NEW ACTIVITY OF HERBIMYCIN A: INHIBITION OF ANGIOGENESIS, J. Antibiotics, 1989, Vol.42, p.1015-7). Thus, the inventions as set forth in claims 1 to 8 and the inventions as set forth in claims 9 to 11 have no special technical feature in common which exceeds prior art.

Such being the case, the inventions as set forth in claims 1 to 8 and the inventions as set forth in claims 9 to 11 (continued to extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
  
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
  
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/07813

Continuation of Box No.II of continuation of first sheet(1)

resides cannot be considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

## <Subject of the search>

Even though the statement in the description is discussed, it cannot be understood to whatever extent of structures are involved in the term "a pharmacologically acceptable derivative" as set forth in claim 1, which makes the scope of the invention unclear.

Thus, claims 1, 2 and 4 to 8 and the description do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out.

In this international search report, the search was made based on examples of the "pharmacologically acceptable derivative" presented in the description.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K31/395, 31/496, A61P3/10, 9/00, 27/02, 29/00,  
35/00, 43/00, C07D498/08 // G01N33/50, 33/15

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K31/395, 31/496, C07D498/08 // G01N33/50, 33/15

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	DEMKOW, Urszula et al., The influence of rifampicin on selected parameters of immunological response, Pneumonologia i Allergologia Polska, 1998, Vol.66, No.1-2, p.45-53	1-8 1-8
X Y	T. YAMASHITA et al., A NEW ACTIVITY OF HERBIMYCIN A: INHIBITION OF ANGIOGENESIS, J. Antibiotics, 1989, Vol.42, No.6, p.1015-7	1,3-8 1-8

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

29.07.03

国際調査報告の発送日

12.08.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

谷尾 忍



4P

9550

電話番号 03-3581-1101 内線 3491

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Yoshimasa UEHARA, Mechanism of Action of an Inhibitor of <i>src</i> Oncogene Group Tyrosine Kinases and Its Effects on Cell Transformation and Growth, 薬学研究の進歩, 1992, Vol.8, p.82-95, Fig.5	1-8
X Y	WO 01/11086 A2 (EOS BIOTECHNOLOGY, INC.) 2001.02.15, 文献全体、特に、CLAIM、第14頁第21～28行参照 & US 2002/0015970 A1 & JP 2003-517816 A	9 10, 11
Y	Masayoshi SHICHIRI et al., Antiangiogenesis signals by endostatin, FASEB Journal, 2001, Vol.15, p.1044-53	10, 11

## 第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6:4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-8記載の発明と請求の範囲9-11記載の発明とに共通する技術的特徴は、血管新生抑制物質であると認められるところ、前記物質は公知であるから[必要であれば、T. YAMASHITA et al., A NEW ACTIVITY OF HERBIMYCIN A: INHIBITION OF ANGIOGENESIS, J. Antibiotics, 1989, Vol. 42, p.1015-7を参照のこと]、請求の範囲1-8記載の発明と請求の範囲9-11記載の発明とは、先行技術を越えるような特別な技術的特徴を共有する関係にない。

してみると、請求の範囲1-8記載の発明と請求の範囲9-11記載の発明とは、単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明ではない。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。



## &lt;調査対象について&gt;

請求の範囲1の「薬理的に許容し得る誘導体」なる語句は、明細書の記載を検討しても、いかなる構造のものまでを包含するものなのか明確であるとはいえないから、本願発明の医薬の範囲を不明確にするものである。

したがって、請求の範囲1、2及び4-8並びに明細書は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない。

なお、本国際調査報告では、明細書に記載された「薬理的に許容し得る誘導体」の例示に基づいて調査を行った。